

イワタバコ (*Conandron ramondiioides*) の葉片培養

樋浦 巖¹⁾・山崎 英優・鈴木 洋²⁾・今西 茂³⁾
(山形大学名誉教授¹⁾, 山形大学農学部農業生産学講座²⁾, 生物機能調節学講座³⁾)
(平成4年9月1日受理)

Leaflet culture of *Conandron ramondiioides*

Iwao HIURA¹⁾, Hidetoshi YAMAZAKI, Hiroshi SUZUKI²⁾, Shigeru IMANISHI³⁾
Professor emeritus Yamagata University¹⁾, Section of Agricultural Production²⁾
and Section of Bioprocess Engineering³⁾,
Faculty of Agriculture,
Yamagata University, Tsuruoka 997, Japan
(Received September 1. 1992)

Summary

With objective of reproducing *Conandron* plants, their leaflet culture was conducted and redifferentiated plants were obtained by the code of the following culture media.

1. In the case of explants taken from large leaflets;

Elements added to M. S. basic medium

(1) Thiamine Hcl : 0.1 or 0.3 ppm, NAA : BA = 1 : 0.01 (ppm)

(2) Thiamine Hcl : 0.3 ppm, NAA : BA = 1 : 0.1 (ppm)

2. In the case of explants taken from small leaflets;

Elements added to M. S. basic medium

(1) Thiamine Hcl : 0.1 ppm, NAA : BA = 0.1 : 0.1 (ppm)

(2) Thiamine Hcl : 0.1 ppm, NAA : BA = 0.1 : 0.01 (ppm)

(3) Thiamine Hcl : 0.1 ppm, NAA : BA = 1 : 0.01 (ppm)

(4) Thiamine Hcl : 0.3 ppm, NAA : BA = 1 : 0.01 (ppm)

ま え が き

イワタバコは本州・四国・九州・沖縄から台湾・中国大陸に分布域を持ち(武田1980)⁴⁾, 谷間の湿った岩地に自生する多年草で夏から秋にかけて開花するが, その花は紫色で花弁は5裂の短漏斗状で小さく, 普通一株に数花を形成する(第1図). 本実験は, この植物を鉢植えとして観賞用に利用するために行った.

既に NIIMI ら (1979, 1985)^{2,3)} および TAKAYAMA ら (1990)⁶⁾ がユリ科植物で, 田中 (1987)⁷⁾ がラン科植物の

ファレノプシスで, 大谷 (1991)⁵⁾ らはシクラメンで葉片体細胞由来の再分化個体を得ることに成功している. さらに, 神吉 (1989)¹⁾ は葉片培養における順化の条件について種々の検討を加えている. イワタバコについてもその繁殖能率を高めることを目的として葉片培養による増殖法を検討し再生分化個体を得たのでここに報告する.

供試材料は日本タバコ産業(株)の郡山支所のご好意により分譲を受けた福島県西白川郡西郷村産株を本学農学部研究室で養成したものである. 厚くお礼を申し上げる次第である.

1) 現石黒学園 College ISHIGURO Gakuen

第1表 設定試験区と培地添加植物ホルモン

ホルモン 比	試験区 No.	N A A : B A ppm	
N A A = B A	a 1	0.01	0.01
	2	0.1	0.1
	3	1	1
N A A < B A	b 1	0.01	0.1
	2	0.01	1
	3	0.1	1
N A A > B A	c 1	0.1	0.01
	2	1	0.01
	3	1	0.1

材料および方法

植え付けた株より萌芽伸長した葉片を3月30日（実験1）と5月2日（実験2）の2回に分けて採取して培養に供した。その際の供試葉片は、実験1、2の各々について供試葉の大きさに差を設け、大葉片区と小葉片区別にデータを得て、それらの合計値で比較を行った。小葉片区は縦43～44 mm、横29～34 mm の大きさの葉片を1区当り9枚供試した。大葉片区は縦65～74 mm、横48 mm の葉片を1区当り6枚または2枚供試した。

培養に当っては葉片を中性洗剤で洗浄後、70%エタノール・カルキ濾液（5～7%）を用いた所定の方法で殺菌し、その後外植体を葉片の葉脈を中心にして約5 mm 四方の切片として切り調整し、これを試験管1本に1外植体ずつ斜面培地へ約1/4埋め込み置床した。培養は25℃、室内光の環境条件下で行った。

培地の植え替えは40～50日毎に行ったが、植え付け後肥大生長した外植体は2～8個に分割して試験管から三角フラスコまたはプラスチック容器に移し変えて培養を継続した。

順化処理は不定根を形成したものから順次取り出してパーミキュライトを入れた殺菌三角フラスコに移して行った。その方法は最初密閉していたフラスコの口のビニールの密閉度を移植固体の活着程度に応じて徐々に低減し、最終的には完全にビニールの蓋を取り去る手順をとった。なお、その際水は2～3日毎に補給した。

培養培地としては、MS 培地にショ糖3%、寒天0.6%を添加したものを基本とし、これに塩酸チアミン濃度に

ついて0.1 ppm、と0.3 ppm の2区を設け、更にそれぞれの区毎にNAAについて0.01、0.1、1 ppm の3濃度、BAについて0.01、0.1、1 ppm の3濃度による9組合せからなる試験区を設定した。これらの試験区は植物ホルモンについてNAA=BA、NAA<BA、NAA>BAの順序で大別して、第1表に示すような試験区番号を付けた。なお、大葉片区は採取葉片数が少なかったため、所定の試験区を設定することが出来なかったものがあった。

1試験区あたりの供試試験管数は実験1では小葉片区：4～5本、大葉片区：5～6本、実験2では小葉片区：4～5本、大葉片区：3～4本であった。



第1図 イワタバコの花

培養に際しての継代数は実験1：5回、実験2：4回であったが、継代最終回の培地組成は全ての試験区について同一条件とし基本培地に対する添加要素を実験1では塩酸チアミン濃度を0.3 ppm、植物ホルモン無添加条件とし、実験2では塩酸チアミン濃度を0.1 ppm、植物ホルモン無添加条件として以後の培養を継続した。この際の塩酸チアミンの濃度設定は継代経過時に於て不定根形成の良い傾向のみられた試験区の濃度から判断した。

結果表示は、第2表に示すように再分化葉数、再分化葉長、不定根数の3形質の再分化程度について、形成程度を3段階に分け、それぞれの形質について基準を設けそれに従って行った。調査はそれぞれの段階毎の固体数を数え、その調査結果に基づいて、試験区を総合した判定を表示した。その判定の方法は形成程度の基準A段階のものがその試験区にあって最も多数を占めた場合をI

第2表 再分化程度の基準表

形成程度	再分化葉数	再分化葉の長さ	不定根数
A	10枚以上	2 cm以上	5 本以上
B	5 ~ 9	1 ~ 1.9	3 ~ 4
C	0 ~ 4	0.9	0 ~ 2

とし、B段階のものがA段階のものより多い場合をⅡとし、C段階のものが90%を越える数値を示したものをⅢとしたものである。なお、このⅢと判定された試験区は再分化固体獲得のためには不利と判断される。

結果および論議

培養経過は、再分化葉・不定根の発生状況、再分化葉

の形成数、その葉身長、不定根の形成数の各項目について観察を行った。2回の実験結果の値の合計値を第3表に示した。

実験結果はつぎに示すようであった。

1. 小葉片区の再分化葉形成数 (第3表)

NAA=BA 群にあっては、塩酸チアミン0.1, 0.3 ppm 濃度区の a1 試験区に反応が認められなかったが、その他の試験区は、0.1, 0.3 ppm 濃度区の何れも判定Ⅱと認められた。

NAA<BA 群にあっては、判定Ⅰが b1 試験区の塩酸チアミン0.1, 0.3 ppm 濃度区と b3 試験区の塩酸チアミン 0.3 ppm 濃度区に認められ、他の試験区は判定Ⅱと認められた。

NAA>BA 群にあっては、塩酸チアミン 0.1 ppm 濃度区にあって c3 試験区は判定Ⅲと認められ、その他の試験区は判定Ⅱであったのに対して 0.3 ppm 濃度区では c2 試験区のみが判定Ⅱと認められ、その他の試験区

第3表 再分化葉形成数 (小葉片区)

ホルモン比	試験区 No.	NAA : BA ppm	形成程度	チアミン (0.1 ppm)			チアミン (0.3 ppm)		
				個	体	数 % 総合判定	個	体	数 % 総合判定
NAA = BA	a 1	0.01 0.01	A	0			0		
			B	0			0		
			C	0			0		
	2	0.1 0.1	A	6	20	} Ⅱ	3	11	} Ⅱ
			B	7	3		4	15	
			C	17	57		20	74	
	3	1 1	A	3	5	} Ⅱ	1	3	} Ⅱ
			B	4	7		5	13	
			C	50	88		32	84	
NAA < BA	b 1	0.01 0.1	A	20	26	} Ⅰ	4	25	} Ⅰ
			B	8	11		1	6	
			C	48	63		11	69	
	2	0.01 1	A	7	11	} Ⅱ	0	90	} Ⅱ
			B	12	18		2	29	
			C	47	71		5	71	
	3	0.1 1	A	18	13	} Ⅱ	18	33	} Ⅰ
			B	26	19		8	15	
			C	93	68		29	52	
NAA > BA	c 1	0.1 0.01	A	1	4	} Ⅱ	0		
			B	4	17		0		
			C	19	79		0		
	2	1 0.01	A	1	2	} Ⅱ	0	0	} Ⅱ
			B	9	20		3	11	
			C	35	78		25	89	
	3	1 0.1	A	0	0	} Ⅲ	0		
			B	1	8		0		
			C	12	92		0		

は無反応であった。

2. 大葉片区の再分化葉形成数（第4表）

全般に反応が鈍く、反応があったものは塩酸チアミン 0.1 ppm 濃度区にあっては NAA=BA 群の a3 試験区と NAA<BA 群の b3 試験区で判定Ⅱ、また NAA<BA 群の c2 試験区が判定Ⅰと認められたが、その他は無反応であった。一方、塩酸チアミン 0.3 ppm 濃度区にあっては b3 試験区が判定Ⅰ、NAA>BA 群の c2、c3 試験区が判定Ⅱと認められたが、その他の試験区は無反応であった。

3. 小葉片区の再分化葉の葉身長（第5表）

NAA=BA 群にあっては、塩酸チアミン 0.1 ppm 濃度区の a2 試験区は判定Ⅱ、a3 試験区は判定Ⅰと認められ、a1 試験区は無反応であった。一方塩酸チアミン 0.3 ppm 濃度区の a2 試験区は判定Ⅰ、a3 試験区は判定Ⅱと認められたが、a1 試験区は無反応であった。

NAA<BA 群にあっては、b2 試験区の塩酸チアミン濃度 0.1、0.3 ppm 濃度区が判定Ⅲと認められ、その他の試験区は判定Ⅱで葉身の伸長は全般にやや劣っていた。

NAA>BA 群にあっては、c1 試験区の塩酸チアミン 0.3 ppm 濃度区と c3 試験区の塩酸チアミン 0.1、0.3 ppm 濃度区には反応が認められなかったが、その他の試験区は判定Ⅱと認められた。

4. 大葉片区の再分化葉の葉身長（第6表）

NAA=BA 群にあっては全般に反応は鈍く、a3 試験区の塩酸チアミン 0.1 ppm 濃度区は判定Ⅲと認められたが、その他の試験区は無反応であった。

NAA<BA 群にあっては、b3 試験区の全てが判定Ⅱと認められた。

NAA>BA 群にあっては、全般に反応は鈍く、c1 試験区は無反応で、c2 試験区は全て判定Ⅱ、c3 試験区は塩酸チアミン 0.1 ppm 濃度区は無反応で、0.3 ppm 濃度区は判定Ⅱと認められた。

5. 小葉片区の不定根形成（第7表）

NAA=BA 群にあっては、a1 試験区は全て無反応、a2 試験区では塩酸チアミン 0.1 ppm 濃度区は判定Ⅰ、0.3 ppm 濃度区は判定Ⅲと認められ、c3 試験区は全て判定Ⅲと認められた。

NAA<BA 群にあっては、全て判定Ⅲと認められた。

NAA>BA 群にあっては、c1 試験区の塩酸チアミン 0.1 ppm 濃度区は判定Ⅱであったが、0.3 ppm 濃度区は無反応、c2 試験区の塩酸チアミン 0.1 ppm 濃度区は判定Ⅰ、0.3 ppm 濃度区は判定Ⅱ、c3 試験区の塩酸チアミン 0.1 ppm 濃度区は判定Ⅲと認められ、0.3 ppm 濃度区は無反応であった。

6. 大葉片区の不定根形成（第8表）

NAA=BA 群にあっては、a2 試験区は無反応、a3 試

第4表 再分化葉形成数（大葉片区）

ホルモン 比	試験 区 No.	NAA : BA ppm	形成 程度	チアミン (0.1 ppm)			チアミン (0.3 ppm)		
				個 体 数	%	総 合 判 定	個 体 数	%	総 合 判 定
NAA =BA	a 2	0.1 0.1	A	0			0		
			B	0			0		
			C	0			0		
	3	1 1	A	3	14	} Ⅱ	0		
			B	5	23		0		
			C	14	63		0		
NAA <BA	b 3	0.1 1	A	9	8	} Ⅱ	54	25	} Ⅰ
			B	20	17		42	20	
			C	78	75		118	55	
NAA >BA	c 1	0.1 0.01	A	0			0		
			B	0			0		
			C	0			0		
	2	1 0.01	A	17	34	} Ⅰ	5	8	} Ⅱ
			B	9	18		18	28	
			C	24	48		42	64	
	3	1 0.1	A	0			1	4	} Ⅱ
			B	0			5	20	
			C	0			9	76	

第5表 再分化葉の葉身長 (小葉片区)

ホルモン 比	試験 区 No.	NAA:BA ppm	形成 程度	チアミン (0.1 ppm)			チアミン (0.3 ppm)		
				個 体 数	%	総 合 判 定	個 体 数	%	総 合 判 定
NAA =BA	a 1	0.01 0.01	A	0			0		
			B	0			0		
			C	0			0		
	2	0.1 0.1	A	3	18	} II	7	64	} I
			B	7	41		3	27	
			C	7	41		1	9	
	3	1 1	A	3	25	} I	0	0	} II
			B	2	17		1	20	
			C	7	58		4	80	
NAA <BA	b 1	0.01 0.1	A	2	6	} II	0	0	} II
			B	8	26		3	50	
			C	21	68		3	50	
	2	0.01 1	A	0	0	} III	0	0	} III
			B	1	6		0	0	
			C	17	94		2	100	
	3	0.1 1	A	1	3	} II	1	3	} II
			B	12	35		9	31	
			C	21	62		19	66	
NAA >BA	c 1	0.1 0.01	A	0	0	} II	0		
			B	3	38		0		
			C	5	62		0		
	2	1 0.01	A	1	11	} II	0	0	} II
			B	3	33		2	29	
			C	5	56		5	71	
	3	1 0.1	A	0			0		
			B	0			0		
			C	0			0		

第6表 再分化葉の葉身長 (大葉片区)

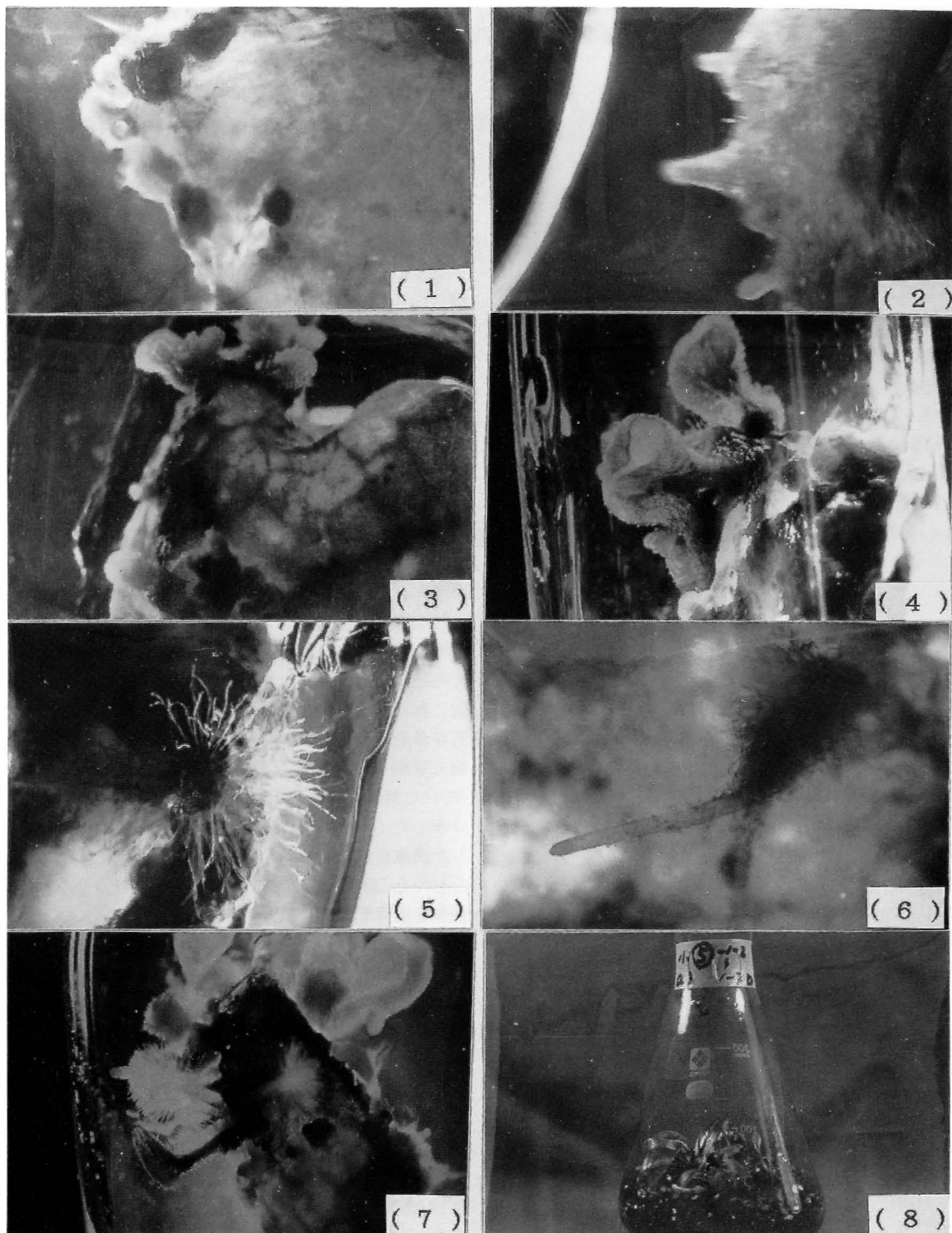
ホルモン 比	試験 区 No.	NAA:BA ppm	形成 程度	チアミン (0.1 ppm)			チアミン (0.3 ppm)		
				個 体 数	%	総 合 判 定	個 体 数	%	総 合 判 定
NAA =BA	a 2	0.1 0.1	A	0			0		
			B	0			0		
			C	0			0		
	3	1 1	A	0	0	} III	0		
			B	0	0		0		
			C	11	100		0		
NAA <BA	b 3	0.1 1	A	2	11	} II	22	25	} II
			B	7	37		34	38	
			C	10	52		33	47	
NAA >BA	c 1	0.1 0.01	A	0			0		
			B	0			0		
			C	0			0		
	2	1 0.01	A	0	0	} II	0	0	} II
			B	2	40		3	21	
			C	3	60		11	79	
	3	1 0.1	A	0			1	13	} II
			B	0			1	13	
			C	0			7	74	

第7表 不定根形成数（小葉片区）

ホルモン 比	試験 区 No.	NAA : BA ppm	形成 程度	チアミン (0.1 ppm)			チアミン (0.3 ppm)		
				個 体 数	%	総 合 判 定	個 体 数	%	総 合 判 定
NAA =BA	a 1	0.01 0.01	A	0			0		
			B	0			0		
			C	0			0		
	2	0.1 0.1	A	4	13	} I	0	0	} III
			B	3	10		1	4	
			C	23	77		26	96	
	3	1 1	A	0	0	} III	1	3	} III
			B	0	0		1	3	
			C	57	100		36	94	
NAA <BA	b 1	0.01 0.1	A	2	3	} III	0	0	} III
			B	3	4		1	6	
			C	71	93		15	94	
	2	0.01 1	A	0	0	} III	0	0	} III
			B	0	0		0	0	
			C	66	100		7	100	
	3	0.1 1	A	0	0	} III	0	0	} III
			B	1	1		2	4	
			C	136	99		53	96	
NAA >BA	c 1	0.1 0.01	A	1	4	} II	0		
			B	3	13		0		
			C	20	83		0		
	2	1 0.01	A	30	67	} I	4	14	} II
			B	9	20		7	25	
			C	6	13		17	61	
	3	1 0.1	A	0	0	} III	0		
			B	0	0		0		
			C	13	100		0		

第8表 不定根形成数（大葉片区）

ホルモン 比	試験 区 No.	NAA : BA ppm	形成 程度	チアミン (0.1 ppm)			チアミン (0.3 ppm)		
				個 体 数	%	総 合 判 定	個 体 数	%	総 合 判 定
NAA =BA	a 2	0.1 0.1	A	0			0		
			B	0			0		
			C	0			0		
	3	1 1	A	0	0	} III	0		
			B	0	0		0		
			C	22	100		0		
NAA <BA	b 3	0.1 1	A	0	0	} III	1	0	} III
			B	0	0		0	0	
			C	107	100		213	100	
NAA >BA	c 1	0.1 0.01	A	0			0		
			B	0			0		
			C	0			0		
	2	1 0.01	A	15	30	} I	26	40	} I
			B	9	18		13	25	
			C	26	52		23	35	
	3	1 0.1	A	0		} II	6	24	} II
			B	0			9	36	
			C	0			10	40	



第2図 イワタバコ再分化の経過と順化個体

- (1): 始め切片周辺部に隆起がおこる。
- (2): 切片周辺部は半透明ゼリー状を呈し、突起を生ずる。
- (3): 突起は発達して再分化葉となる。
- (4): 再分化葉はさらに肥大する。
- (5): 再分化葉基部辺に多数の細根を発生する。
- (6): 細根群に混じって太い再分化根が発生する。
- (7): 再分化葉および再分化根が発生したもの。
- (8): 順化個体。

験区は塩酸チアミン 0.1 ppm 濃度区は判定Ⅲのみで 0.3 ppm は無反応であった。

NAA<BA 群にあっては、b3 試験区のみであったが、判定Ⅲであった。

NAA>BA 群にあっては、a1 試験区は全て無反応、c2 試験区は全て判定Ⅰ、c3 試験区は塩酸チアミン 0.1 ppm 濃度区は無反応であったが、0.3 ppm 濃度区は判定Ⅱと認められた。

不定根を形成した個体は順次順化处理に移したが、処理に成功したものは大葉片区のものがやや多い傾向が見られた。

以上の結果について、器官再分化と培地添加要素の関係を検討してみると次のようになる。

塩酸アミチンについては、小葉片区にあっては NAA=BA 群、NAA<BA 群、ともに 0.1 と 0.3 ppm 濃度区の間に差は認められなかった。NAA>BA 群にあっては 0.1 ppm 濃度区の全ての試験区に反応が認められたが、0.3 ppm 濃度区には無反応の試験区 (c1, c3) が現れ、この試験区の植物ホルモン NAA:BA 比はいずれも 1/10 で NAA と BA の相互作用が推定された。一方、大葉片区にあっては NAA=BA 群、NAA<BA 群ともに小葉片区と同様の関係が認められた。NAA>BA 群にあっては c1 試験区について塩酸チアミン 0.3 ppm 濃度区と 0.1 ppm 濃度区がともに無反応となり、c3 試験区については 0.1 ppm 濃度区は無反応であったのに対して、0.3 ppm 濃度区には反応が認められ、葉片の大小による生理的反応差の存在が推定された。

植物ホルモンについては 0.01 ppm の濃度レベルの NAA=BA の割合では反応がなかったため、NAA と BA の間には濃度に関して一定の差異が必要であることが推定された。

次に、再分化個体獲得の面から培地設計を検討してみると、再分化葉の形成ならびに伸長と不定根の形成が共に良好と認められる判定Ⅰであったものは、大葉片区;c2 試験区の塩酸チアミン 0.1 ppm 濃度区のみであった。しかし、再分化葉の形成・伸長については判定Ⅱであり、不定根の形成については判定Ⅰであったものには、小葉片区;a2, c2 試験区と大葉片区;c2 試験区があった。また再分化葉ならびに不定根の形成・伸長共に判定Ⅱであったものとして、小葉片区;c1 試験区の塩酸チアミン 0.1 ppm 濃度区と c2 試験区の塩酸チアミン 0.3 ppm 濃度区および大葉片区;c3 試験区の塩酸チアミン 0.3 ppm 濃度区があり、これらの試験区からは再生分化個体が得られた。これらの試験区は a2 試験区 (NAA=BA 群) を除き全て c 試験区 (NAA>BA 群) であった。このことからこれらの試験区の植物ホルモン BA の濃度レベル (0.1 ppm 以下) が不定根の形成に重要であることが推定された。

なお最後にイワタバコの再分化の経過を第2図〔(1)～(8)〕に示した。まず葉切片周辺部に (1) に示したような球状の隆起が生じ、次いで周辺全体に互り半透明のゼリー状を呈するようになった。先の隆起はさらに生長して突起状の器官を形成し (2)、これらは次第に扁平な形態を呈するようになり〔(3)～(4)〕、緑色も濃くなって明確に細分化葉として認められるものとなった。この後これら細分化葉の基部辺に細く短い毛根と見られる器官が多数分化した (5)。そしてこれら毛根群の中から毛根とは明らかに異質な太くて長い再分化根を発生した (6)。これら再分化根上にも先端を除いて多数の毛根が分岐した (7)。このように葉と根の両者について再分化した個体をさらに生長させた後、切り分けて順化に移したものを (8) に示したが順調に生育を続け完全な再分化個体を獲得することが出来た。

摘 要

野生イワタバコの増殖を目的とした葉片培養を試み、再分化個体を得た。その培養試験区は大葉片区では塩酸チアミン 0.1, 0.3 ppm 濃度区の NAA>BA 群の c2 試験区 (NAA:BA=1:0.01) と塩酸チアミン 0.3 ppm 濃度区の c3 試験区 (NAA:BA=1:0.1) であった。一方、小葉区では塩酸チアミン濃度 0.1 ppm 区の NAA=BA 群の a2 試験区 (NAA:BA=0.1:0.1) と NAA>BA 群の c1 試験区 (NAA:BA=0.1:0.01) と c2 試験区 (NAA:BA=1:0.01) および塩酸チアミン 0.3 ppm 濃

度区の c2 試験区であった。

なお、再分化個体形成と培養培地の添加要素の関係について考察を行った。

引用文献

- 1) 神吉久遠：1989, 植物の培養における順化を考える——寒天培地の除去は必要か——, 農及園, 64 : 1414
- 2) NIIMI, Y. and ONOZAWA, T. : 1979. In vitro bulblet formation from leaf segments of lilies, especially *Lilium rubellum* B. Scientia Hortic., 11 : 379-389
- 3) NIIMI, Y. : 1985. Factors affecting the regeneration and growth of bulblets in bulb-scale cultures *Lilium rubellum* Baker.
- 4) 武田 久：1980. *Conandron* 属について, 最新園芸大辞典, 2 : 500 J. Japan. Soc. Sci. 54 : 82-86
- 5) OTANI, M. and T. SHIMADA : 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from *Cyclamen persicum* M. leaf cultures. Plant Tissue Culture Letters. 8(2), 121-123
- 6) TAKAYAMA, S. and K. OHKAWA : 1990. Growth and flowering of in vitro-propagated *Lilium auratum* bulb in soil. Plant Tissue Culture Letters, 7 (3), 187-192
- 7) 田中道男：1987 組織培養によるフアレノプシスの栄養繁殖に関する研究, 香川大学農学部紀要 49 : 1-85